

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ NaCl НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ТИЛАКОИДНЫХ МЕМБРАН ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

С.Ю.СУЛЕЙМАНОВ, И.М.ГУСЕЙНОВА, Э.А.АБДУЛЛАЕВА, Д.А.АЛИЕВ

Институт ботаники НАН Азербайджана

Одной из важнейших проблем современной биологии является расшифровка механизмов реагирования растительных организмов на изменение условий их существования, особенно на действие экстремальных факторов, вызывающих у клеток состояние стресса. Среди лимитирующих факторов продуктивности растений находится засоление почв, которое затрагивает почти большинство их функции [5]. Поэтому получение толерантных к солевому стрессу сельскохозяйственных растений было и остается важнейшей задачей практической селекции. Для решения этой проблемы необходимо подробное понимание молекулярно-генетических основ солеустойчивости и механизмов адаптации растений к избытку солей.

Адаптивные процессы включают биосинтез осмолитов, внутриклеточных веществ [6], изменение ионного транспорта и метаболических функций [23,13]. Особую актуальность приобретают исследования, направленные на изучение экспрессии генов и белков, индуцируемых под действием высокой концентрации соли и вовлеченных в процесс адаптации растительного организма [19], которые могут служить маркерами устойчивости растений и используются для создания трансгенных солеустойчивых растений [19, 16].

В условиях хлоридного засоления поглощение клетками ионов и нейтрализация токсичного действия ионов Na^+ и Cl^- является интегральным компонентом осмотического регулирования, необходимого для адаптации к солевому стрессу [8, 7, 20] и Ca^{2+} играет фундаментальную роль в этом процессе [12].

Имеется гипотеза, что новые полипептиды, индуцируемые при солевом стрессе, вероятно, связываются с мембранами, чтобы облегчить работу ионного насоса [16]. Много известно о генах, ответственных за компартментизацию ионов [22,17]. Во всех растениях, под толерантностью предполагается поддержание продолжительного меристематического роста и фотосинтеза.

Исходя из выше изложенного, целью данной работы являлось изучение изменения в белковом составе и функциональных характеристиках фотосинтетических мембран хлоропластов пшеницы при воздействии различных концентраций хлорида

натрия.

Семена двух сортов пшеницы (*Triticum durum* L. сорта Баракатли- 95 и *Triticum aestivum* L. сорта Азаматли-95) и ячменя (*Hordeum vulgare* L.) после набухания в течение 12 ч. проращивали 3 дня в полной темноте в чашках Петри, смоченных водой при факторостатных условиях. Далее их перенесли на освещенность при интенсивности света 6000 лк, 12-часовом фотопериоде и температуре 25/20°C (день/ночь). В качестве фактора, вызывающего засоление, использовали хлорид натрия (NaCl). Для изучения влияния засоления на 7-8 дневные проростки пшеницы и ячменя применяли NaCl в концентрациях 100; 150 ; 200 и 250 мМ в течении 72 ч. Проростки из контрольных и обработанных культур были собраны на 10-ый день после посева.

Выделение хлоропластов и тилакоидных мембран проводили по методу, описанному в работе [1]. Содержание хлорофиллов а и б оценивали по спектрам поглощения 80%-ных ацетоновых экстрактов листьев [14].

Анализ полипептидного состава образцов осуществляли путем аналитического электрофореза в градиентном ПААГ(10-25%) с Ds-Na по методу Леммли [11]. Гели окрашивали в течение 30 мин 0,04%-ным раствором Кумасси G-250, приготовленным на 3,5%-ной хлорной кислоте (HClO_4), сканирование пластин производилось на лазерном денситометре ULTROSAN-2202 ("ЛКБ", Швеция).

Спектральные измерения при 77 К проводили на двухлучевом спектрофотометре Hitachi-557 (Япония) и на спектрофлуориметре Hitachi-850 (Япония), как описано нами ранее [2]. Фотохимическую активность хлоропластов определили полярографическим методом по выделению и поглощению кислорода с использованием платинового электрода типа Кларка [3]. Реакционная среда содержала 80 мМ сахарозу, 10 мМ NaCl, 10мМ MgCl_2 , 30 мМ Трис-HCl буфер, pH 7.4. Содержание хлоропластов в среде было эквивалентно 100 мкг Хл.

Нами обнаружено, что высокая концентрация NaCl сопровождается определенными качественными и количественными изменениями в составе мембранных белков. Исследованный нами метод одномерного электрофореза позволил обнаружить

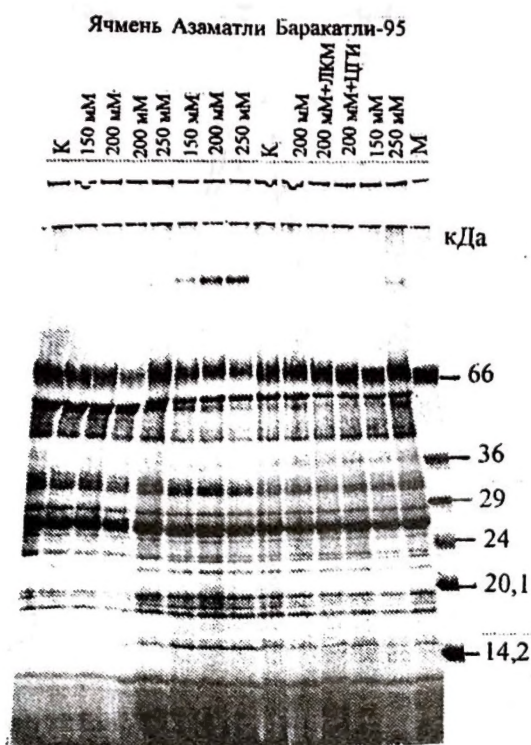


Рис.1. Электрофореграмма белков тилакоидных мембран хлоропластов в 10-25%-ном ПААГ с Ds-Na. М-стандартные белки-маркеры: 66 кДа (бычий сывороточный альбумин), 36 кДа (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа), 29 кДа (карбоангидраза), 24 кДа (трипсиноген), 20,1 кДа (ингибитор трипсина), 14,4 кДа (α -лактальбумин). Электрофорез был проведен в Трис-глициновом буфере, pH 8,3, при 4°C в течение 14 ч.

около 25 полос с молекулярной массой от 68 до 10 кДа (Рис.1). В отличие от сорта пшеницы Баракатли-95 и ячменя, у сорта Азаматли на электрофореграмме наблюдается Хл а-белок ФС I с мол. массой около 120 кДа. В случае Баракатли-95, эта полоса выявляется только при воздействии высокой концентрации NaCl (250 mM). Аналогичные данные получены и в работе [10], в которой показано увеличение содержания ФС I с повышением концентрации NaCl.

Под действием NaCl в составе и содержании белков ССК и цитохром *b₆f* комплекса заметные изменения не наблюдались. Из электрофореграммы видно, что полипептид в области 34 кДа обнаруживается в контрольных проростках в низком количестве у сорта Баракатли-95, но интенсивность этого полипептида усиливается с увеличением концентрации соли в среде, что особенно ярко выражено при 250 mM NaCl. Значительное накопление 34 кДа белка (так названный *cdsp34*) было также обнаружено в тилакоидах, подвергнутых водному дефициту [5] и после промывания тилакоидных фракций с высокой концентрацией соли (300 mM). Иммуно-блотт анализом белков из стромы и тилакоидов гран обнаружено, что содержание *cdsp34* белка больше в ламеллах по сравнению с граналь-

ными тилакоидами. Таким образом, можно полагать, что *cdsp34* белок преимущественно локализуется в нестыкованных тилакоидах стромы и играет структурную и защитную роль в толерантности фотосинтетических мембран к засолению и засухе.

Согласно электрофореграмме (Рис.1), синтез полипептида в области 17,5 кДа также усиливается с увеличением концентрации соли. Однако ингибиторы синтеза белка в хлоропластах и цитоплазме (линкомицин и циклогексимид соответственно) в присутствии 200 mM хлорида натрия почти полностью подавляют синтез этого белка. При этом и уменьшается синтез α - и β -субъединицы внешнего домена CF₁ АТФ-синтазного комплекса.

Усиленный синтез *cdsp34* и 17,5 кДа полипептидов при стрессе, вызванном хлоридом натрия, предполагает существенную роль этих полипептидов в защитном механизме фотосинтетических мембран.

Обработка растений в среде различными концентрациями соли вызывает и определенные изменения в нативном состоянии пигментного аппарата хлоропластов.

В низкотемпературном спектре флуоресценции (77 K) у обработанных хлоропластов (150 mM NaCl) главная полоса, которая локализована при 740-741 нм у контроля, сдвигается на 3-4 нм в коротковолновую область (Рис.2). Одновременно уменьшается интенсивность полос в коротковолновой области при 687 и 696 нм. Полосы при 687 и 696 нм обусловлены испусканием антенны комплекса ФС II, тогда как наиболее интенсивная полоса в низкотемпературном спектре флуоресценции вышних растений при 740 нм обусловлена испусканием хлорофиллов, связанных со светособирающим комплексом ФС I (ССК I) [15]. Эти изменения в спектре более заметны при действии 200 mM NaCl и при этом сильно уменьшается соотношение F736/F687. Если хлоропласты инкубировать в среде с низкой концентрацией соли и валентности ионов, комплексы ФС I выделяются в виде тримеров. Обработка в среде с высокой концентрацией соли (около 150 mM) приводит к выделению из таких мембран, главным образом, мономерных комплексов. Можно предполагать, что электростатическое воздействие солей на линкерные белки комплекса ФС I приводит к дезагрегации тримеров, в результате происходит нарушение перераспределения энергии между ФС I и ФС II. Имеются в литературе данные, что отмывание солей из мембран цианобактерии *Spirulina*, инкубированных в среде с солями в концентрации 150 mM, вызывает обратимую агрегацию мономеров в тримеры, что прослеживалось по усилению интенсивности флуоресценции при 760 нм [10].

Четвертые производные спектров поглощения (A^{IV}) исследованных препаратов показали, что различные концентрации NaCl не приводят к особым изменениям в локализации и организации нативных форм хлорофилла (рисунок не приводится). При этом увеличивается интенсивность полосы Хл а при 683 нм (особенно у сорта Баракатли -95- почти в 2 раза). Нами обнаружено, что в присутствии 200 мМ NaCl, если в среду добавить ингибитор трансляции в хлоропластах - линкомицин, на спектре увеличиваются интенсивности полос Хл б при 648 нм и Хл а при 676 нм, которые относят к ССК и заметно уменьшается содержание формы Хл а при 683 нм.

Одновременно полностью исчезают полосы при 696 и 704 нм. А в опытах с циклогексимидом - ингибитором трансляции в цитоплазме, наоборот, уменьшается интенсивность полосы Хл а при 676 нм и исчезают длинноволновые формы хлорофилла. Предполагается, что длинноволновые формы Хл фокусируют энергию на РЦ или защищают РЦ от избытка энергии возбуждения. Наличие большего числа длинноволновых форм хлорофилла в ядрах пигмент-белковых комплексов ФС I указывает на их роль в миграции энергии от антенны к Р680 или в защите комплекса от фотодеструкции.

Значительные изменения наблюдаются и в фотохимической активности хлоропластов при засолении. Активность выделения кислорода (тест на ФС II) у обработанных препаратов увеличивается с повышением концентрации хлорида натрия, доходит до максимума при 200 мМ и затем сильно уменьшается. При инкубации препаратов с 250 мМ NaCl, скорость выделения кислорода на 90% ингибируется.

Согласно литературе, добавление 23 кДа белка к тилакоидам при низкой ионной силе восстанавливает больше половины потерянной активнос-

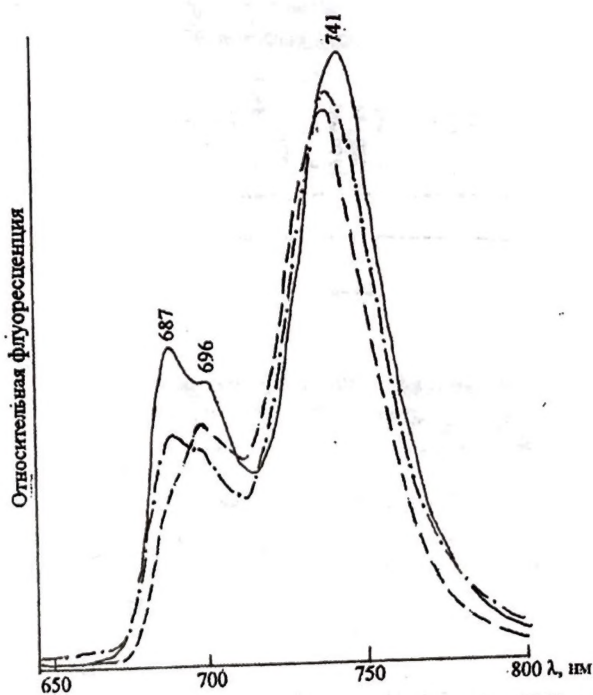


Рис. 2. Спектры флуоресценции хлоропластов при 77 К, выделенных из проростков пшеницы сорта Баракатли-95: контроль (—); после обработки 150 мМ NaCl (---); после обработки 200 мМ NaCl (-.-).

ти ФС II [21]. Однако, добавлением 16 кДа белка или комбинация его с глицерином не проявляет положительного эффекта. На основе этих данных можно полагать, что 23 кДа полипептид является важным компонентом у NaCl адаптированных клеток и более тесно связан с комплексом ФС II. Обнаружено также, что использованные концентрации NaCl вызывают уменьшение (хотя и незначительное) активности ФС I.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о значительной перестройке в фотосинтетическом аппарате исследованных растений в ходе адаптации к условиям повышения засоления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиев Д.А., Гусейнова И.М., Сулейманов С.Ю., Зулфугаров И.С. (2001) Биохимия, т.66, вып.5, с.610-616.
2. Асадов А.А., Зулфугаров И.С., Сулейманов С.Ю., Алиев Д.А. (1986) ДАН СССР, т.287, с.444-447.
3. Гришина Г.С. Биофизические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971, с.38-43.
4. Bohnert H.J., Jensen R.G. (1996) Aust. J Plant Physiol., v. 23, p.661-667.
5. Cuine S., Peltier G., Rey P. (1995) In: Photosynthesis: from Light to Biosphere (Ed. by P.Mathis), Kluwer Academic Publishers, v.4, p.569-572.
6. Delauney A.J., Verma D.P. (1993) Plant J., v.4, p.215-223.
7. Gomez J.M., Hernandez J.A., Jimenez A., del Rio L.A., Sevilla F. (1999) Free Radic Res., v.31, p.511-518.
8. Hernandez J.A., Campillo A., Jimenez A., Alarcon J.J., Sevilla F. (1999) New Phytol., v.141, p.241-251.
9. Ishikawa H., Hibino T., Takabe T. (1995) In: Photosynthesis: from Light to Biosphere (Ed. by P.Mathis), Kluwer Academic Publishers, v.4, p.609-612.
10. Karapetyan N.V., Dorra D., Schweitzer G., Bezsmertnaya I.M., Holzwarth A.R. (1997) Biochemistry, v.36, p.13830-13837.
11. Laemmli U.K. (1970) Nature, v.227, p.680-685.
12. Liu J., Zhu J.K. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), v.94, p.14960-14964.
13. Liu J., Zhu K. (1998) Science, v.280, p.1943-1945.
14. McKinney G.J. (1941) J.Biol.Chem., v.140(2), p.315-322.
15. Mullet J.E., Burke J.J., Arntzen C.J. (1980) Plant Physiol., v.65, p.814-822.
16. Nagvi S.M.S., Ozalp V.C., Oktem H.A., Yucel M. (1995) Proceedings of International Symposium on Biotechnology for Sustainable Development (eds by K.A.Malik, A.Nazim and A.M.Khalid), p.165-170.
17. Ozturk Z.N., Talame V., Deyholos M., Michalowski C.S., Galbraith D.W., Gozukirmizi N., Tuberosa R., Bohnert H.J. (2002) PMB, v.48, p.551-573.
18. Rani, Reddy A.R. (1993) Ibid., v.142, p.88-93.
19. Romero-Aranda R., Moya J.K., Tadeo F.R., Ledez F., Primo-Millo E., Talon M. (1998) Plant Cell Environ., v.21, p.1243-1253.
20. Satoh F., Kanda y., Shiga M., Oshita y., Murata K., Yanada Y. (1995) In: Photosynthesis: from Light to Biosphere (Ed. by P.Mathis), Kluwer Academic Publishers, v.4, p.601-614.
21. Schachtman D., Liu W. (1999) Trends Plant Sci., v.4, p.281-287.
22. Zhu J.K. (2002) Ann Rev Plant Biol., v.53, p.247-273.